

PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局  
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類6 C12Q 1/68, C12N 15/11, C07H 21/04		A1	(11) 国際公開番号 <b>WO97/10359</b>
			(43) 国際公開日 1997年3月20日(20.03.97)
(21) 国際出願番号 PCT/JP96/02617			(81) 指定国 CA, JP, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
(22) 国際出願日 1996年9月13日(13.09.96)			
(30) 優先権データ 特願平7/260883 1995年9月13日(13.09.95)		JP	添付公開書類 国際調査報告書
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 湧永製薬株式会社 (WAKUNAGA SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA)[JP/JP] 〒532 大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号 Osaka, (JP)			
(72) 発明者 : および (75) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 岡 孝紀(OKA, Takanori)[JP/JP] 〒739-11 広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内 Hiroshima, (JP)			
(74) 代理人 弁理士 小島隆司(KOJIMA, Takashi) 〒104 東京都中央区銀座2丁目13番19号 銀座森澤ビル3階 Tokyo, (JP)			
(54) Title: METHOD FOR CONCENTRATING VARIANT NUCLEIC ACID AND NUCLEIC ACID CONCENTRATION TEST KIT FOR EFFECTING THE METHOD			
(54) 発明の名称 変異核酸の濃縮方法、該濃縮方法を実施するための核酸濃縮用検査セット			
(57) Abstract A method for concentrating a variant nucleic acid which comprises effecting once a cycle consisting of the steps (1 to 3) to be described below or repeating the cycle at least twice: (1) the step of the preparation of a sample nucleic acid by amplifying a specific region of the target nucleic acid; (2) the step of the competitive hybridization comprising adding to the sample nucleic acid at least an equimolar amount of a standard labeled nucleic acid prepared by introducing a labeling substance capable of binding to a solid-phase carrier into a nucleic acid having a base sequence complementary to the normal nucleic acid in the specific region of the target nucleic acid, followed by mixing; and (3) the step of the separation and removal of the hybridization product having the labeling substance capable of binding to a solid-phase carrier and the remaining standard labeled nucleic acid contained in the reaction mixture after the competitive hybridization by trapping in a solid-phase carrier.			

ATTORNEY DOCKET NUMBER.: 1803-337

SERIAL NUMBER.: 09/756,743

REFERENCE: A100

(57) 要約 目的核酸の特定領域の変異核酸を選択的に濃縮する方法であって、

下記工程 (1) ~ (3)

- (1) 目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製する工程、
- (2) 目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する核酸に固相担体と結合可能な標識物を導入した標識標準核酸を、試料核酸に対して等モル以上添加・混合し、コンペティティブハイブリダイゼーションを行う工程、
- (3) コンペティティブハイブリダイゼーション後の反応液中に含まれる、固相担体と結合可能な標識物を有するハイブリダイゼーション生成物及び残存する標識標準核酸を固相担体にトラップして反応液から分離・除去する工程、

からなる一連の工程、又は下記工程 (1') ~ (4')

- (1') 目的核酸の特定領域を増幅すると共に、該増幅物に固相担体と結合可能な2種類の標識物を導入して標識試料核酸を調製する工程、
- (2') 目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する標準核酸を、標識試料核酸に対して等モル以上添加・混合し、コンペティティブハイブリダイゼーションを行う工程、
- (3') コンペティティブハイブリダイゼーション後の反応液を一方の標識物と選択的に結合する第1の固相担体にトラップさせて、該一方の標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を捕獲する工程、
- (4') 上記(3')工程で捕獲したハイブリダイゼーション生成物を他方の標識物と選択的に結合する第2の固相担体にトラップさせて、上記両標識物を有するハイブリダイゼーション生成物又は該生成物由来の一本鎖核酸を捕獲する工程、

からなる一連の工程を1サイクルとし、このサイクルを1回若しくは複数回繰り返すか、又は上記サイクルを1回行った後、上記工程(2)と(3)若しくは上記工程(2')~(4')を1回若しくは複数回繰り返すことを特徴とする変異核酸の濃縮方法を提供する。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願をパンフレット第一頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AL	アルバニア	EE	エストニア	RU	ロシア連邦
AM	アルメニア	ES	スペイン	SD	スードアン
AT	オーストリア	FI	フィンランド	SE	スウェーデン
AU	オーストラリア	FR	フランス	SG	シンガポール
AZ	アゼルバイジャン	GAB	ガボン	SI	スロヴェニア
BB	バルバドス	GB	イギリス	SK	スロバキア共和国
BE	ベルギー	GE	グルジア	SN	セネガル
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	SZ	スワジランド
BG	ブルガリア	GN	ギニア	TD	チャード
BJ	ベナン	GR	ギリシャ	TG	トーゴ
BR	ブラジル	HU	ハンガリー	TJ	タジキスタン
BY	ベラルーシ	IE	アイルランド	TM	トルクメニスタン
CA	カナダ	IS	アイスランド	TR	トルコ
CF	中央アフリカ共和国	IT	イタリア	TT	トリニダード・トバゴ
CG	コンゴー	JP	日本	UA	ウクライナ
CH	スイス	KE	ケニア	UG	ウガンダ
CI	コート・ジボアール	KG	キルギスタン	US	米国
CM	カメルーン	KP	朝鮮民主主義人民共和国	UZ	ウズベキスタン共和国
CN	中国	KR	大韓民国	VN	ヴィエトナム
CZ	チェコ共和国	KZ	カザフスタン	YU	ユーゴスラビア
DE	ドイツ	L	リヒテンシュタイン		
DK	デンマーク	LK	スリランカ		

## 明細書

変異核酸の濃縮方法、該濃縮方法を実施するための核酸濃縮用検査  
セット

## 5 技術分野

本発明は、検体中の目的核酸の特定領域の特定の塩基配列を有する核酸と、それとはわずかに異なる塩基配列を有する微量の変異核酸とが混在する検体中から、正常核酸を選択的に分離・除去し、又は変異核酸を選択的に分離・捕獲して、変異核酸を濃縮する核酸の濃縮方法、及び該濃縮方法を実施するための核酸濃縮用検査セットに関する。

## 背景技術

近年、分子生物学、遺伝学の進歩は著しく、これらの蓄積された成果は生命現象の化学的、物理学的解明に寄与するのみならず、人間に対して、特に医学や医療に対しても大きな影響を与え、D N Aから出発するD N A医学が予想を遥かに超えて臨床分野にまで急速に広がりつつある。また、最近では、ほとんどすべての疾患にD N Aが関与していることが解明されてきており、遺伝子レベルでの診断が必要不可欠なものとなってきている。

20 今日、遺伝子疾患として知られているものには先天的代謝異常として古くから知られていた数多くの酵素欠損症がほとんど該当することがわかってきており、これらの遺伝子診断をするためには遺伝子上の塩基配列の変異を検出することが極めて有効である。

一方、後天的な遺伝子異常によって引き起こされる疾患、即ち癌などの遺伝子診断を行う場合、癌病片から癌細胞のみを集めることは非常に困難であり、常に正常細胞が混入してしまう。従って、正常細胞と癌細胞が共存する状況下で、癌細胞中の変異遺伝子のみを特異的に検出することが必要となる。この場合、現在用いられている検出方法では、変異遺伝子が正常遺伝子の10分の1程度、即ち、

癌細胞が正常細胞の5～10分の1程度存在している場合はその検出が可能であるが、それ以下の微量の場合には検出は困難であり、癌の早期診断、早期治療に十分な成果を上げるには至っていない。

- 近年、PCR (Polymerase Chain Reaction) 法等の遺伝子増幅法の開発により単に遺伝子量を増大させることは容易となった。しかし、癌細胞と正常細胞、或いは正常人と特定の遺伝病患者の原因となっている遺伝子の変異を同定する場合には、単に遺伝子量を増大させるだけではなく、試料中に含まれる変異遺伝子の比率を増大させることが必要となる。この場合、一方の細胞で特定遺伝子がかなり大きな領域で欠損又は挿入されていたり、或いは一方の細胞だけでその遺伝子が発現している場合にはサブトラクション法 (In Current Protocol in Molecular Biology, (1992), John Wiley & Sons, Inc.) により特定遺伝子を選択的に濃縮することが可能である。
- しかしながら、上記サブトラクション法では、原因となる遺伝子の変異がわずかな場合、即ち、遺伝子の欠失、付加或いは置換等変異の領域が極めて小さい場合や、両者の遺伝子発現のレベルに差が見られない場合には、変異遺伝子の同定は事実上困難であった。

#### 発明の開示

- 本発明は、上記事情に鑑みなされたものであり、検体中の目的核酸の特定領域の正常核酸と微量に存在する変異核酸とが混在するような状態であっても、容易かつ確実に検体中の変異核酸を濃縮することができ、微量な変異核酸の検出及び変異核酸の同定を可能とする核酸の濃縮方法、及び該濃縮方法を実施するための核酸濃縮用検査セットを提供することを目的とする。

本発明者らは、上記目的を達成するために、検体中の目的核酸の特定領域の正常核酸とその変異核酸とが混在している検体中から変異核酸のみを選択的に濃縮する方法について鋭意検討を行った結果、検体中の正常核酸及び変異核酸を増幅して試料核酸とし、固相担体

と結合可能な標識物を導入した正常核酸増幅物を標識標準核酸として、上記試料核酸に対して等量以上の標識標準核酸を添加・混合し、熱変性を行った後、非常に緩やかな温度勾配でコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイゼーション後の反応液中から固相担体と結合可能な標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を固相担体にトラップして分離・除去することにより、反応液中から正常核酸のみを選択的に除去し得、容易かつ確実に変異核酸を濃縮することができるを見出し、本発明を完成したものである。

即ち、本発明は、本発明者らが、先に提案した核酸の同一性を識別する方法であるPCR-PHFA法(PCT/JP94/01106、Nucl. Acids. Rec. 22, 1541(1994))を変異核酸の濃縮方法として改良・発展させたものであり、正常核酸と変異核酸とがわずか1塩基でも異なる場合には上記PCR-PHFA法のコンペティティブハイブリダイゼーションにより、完全に相補的な塩基配列を持つもの同士がより優先的に二本鎖を形成する性質を利用して変異核酸の濃縮を行うものである。

その原理を説明すれば、例えば正常核酸とわずかに変異した核酸が微量混在している検体を増幅して試料核酸とし、一方、正常核酸を増幅し、この増幅物に固相担体に結合可能な標識物を導入して標識標準核酸とし、この標識標準核酸を上記試料核酸に等モル以上添加・混合して非常に緩やかな温度勾配によりコンペティティブハイブリダイゼーションを行うと、ハイブリダイゼーション後の反応液中に含まれる正常核酸は、固相担体と結合可能な標識物が導入された標識標準核酸の核酸鎖(正常核酸から増幅反応により得られた核酸鎖)と完全に相補的な塩基配列を持つことになり、これと二本鎖を形成する。このため、変異核酸に由来するものはこの条件では固相担体と結合可能な標識物が導入された合成核酸鎖よりも、元の相補鎖(固相担体と結合可能な標識物を持たない)と優先的に二本鎖

を形成する。従って、この反応液を上記標識物と特異的に結合する官能基を導入した固相担体に吸着させれば、固相担体と結合可能な標識物が導入された二本鎖核酸が選択的に固相担体に結合する。そして、この固相担体に結合しなかった画分を回収すれば元の増幅物  
5 から正常核酸だけが除去されたものを得ることができ、結果として、変異核酸が濃縮されることとなる。

この場合、検体中に含まれる変異核酸が極微量であっても、上記一連の濃縮操作或いは上記コンペティティブハイブリダイゼーション以降の操作を2回以上繰り返すことにより、変異核酸のみを選択  
10 的に濃縮して検出可能な濃度にまで確実に濃縮することが可能となる。この結果、変異核酸量が増大するだけでなく、試料中に含まれる変異核酸の比率も増大するため変異核酸の検出が容易かつ確実となり、更には変異核酸の同定を可能とし、変異の解析により遺伝病の解明、更には治療へと発展させることが可能となる。

15 更に、この方法によれば、癌細胞と正常細胞、或いは正常人と特定の遺伝病患者で原因となっている遺伝子の変異を同定する場合において、従来のサブトラクション法では濃縮することが困難であった、原因となる遺伝子の変異がわずかな場合、即ち遺伝子の欠失、付加或いは置換等変異の領域が極めて小さく、遺伝子発現のレベル  
20 に差が見られないような場合でも、その遺伝子を選択的かつ確実に濃縮することができ、変異遺伝子の同定を容易かつ確実に行うことが可能となる。

また、正常細胞と異常細胞が共存する検体の中から微量に含まれる異常細胞由来の変異核酸を濃縮する際には、目的核酸が二本鎖の  
25 D N Aの場合に限らず、一本鎖D N A、一本鎖若しくは二本鎖のR N Aを目的に合わせて組み合わせて使用することができ、D N Aの変異だけでなく、細胞内のm R N A (m e s s e n g e r R N A)の異常の検出、更には、m R N Aに対する染色体D N Aの異常の検出にも幅広く適応することができるものである。

従って、本発明は第1の発明として、目的核酸の特定領域の変異核酸を選択的に濃縮する方法であって、

下記工程(1)～(3)

- (1) 目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製する工程、  
5 (2) 目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する核酸に固相担体と結合可能な標識物を導入した標識標準核酸を、試料核酸に対して等モル以上添加・混合し、コンペティティブハイブリダイゼーションを行う工程、  
10 (3) コンペティティブハイブリダイゼーション後の反応液中に含まれる、固相担体と結合可能な標識物を有するハイブリダイゼーション生成物及び残存する標識標準核酸を固相担体にトラップして反応液から分離・除去する工程、  
15 からなる一連の工程を1サイクルとし、該サイクルを1回若しくは複数回繰り返すか、又は上記サイクルを1回行った後、上記工程(2)と(3)を1回若しくは複数回繰り返すことを特徴とする変異核酸の濃縮方法を提供する。

また、この濃縮方法を実施するための濃縮用検査セットとして、目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製するための試料核酸増幅用試薬と、目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する核酸に固相担体と結合可能な標識物を導入した標識標準核酸と、上記標識物と結合可能な部位を有する固相担体とを具備してなることを特徴とする核酸濃縮用検査セットを提供する。

また、本発明者らは、更に検討を進めた結果、上記の方法とは逆に、検体中の正常核酸及び変異核酸を増幅した試料核酸に固相担体と結合可能な2種類の標識物を導入して標識試料核酸とし、この標識試料核酸に正常核酸増幅物を標準核酸として等量以上添加・混合し、熱変性を行った後、非常に緩やかな温度勾配でコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、ハイブリダイゼーション後の反応液中から上記一方の標識物を有するハイブリダイゼーション生成

物を、該一方の標識物と選択的に結合する第1の固相担体にトラップして捕獲し、更にこの捕獲したハイブリダイゼーション生成物の中から上記他方の標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を、該他方の標識物と選択的に結合する第2の固相担体にトラップして、  
5 上記両標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を捕獲するか、又は第1の固相担体にトラップしたハイブリダイゼーション生成物を変性させて1本鎖核酸にした後、該1本鎖核酸を他方の標識物と選択的に結合する第2の固相担体にトラップして、他方の標識物のみを有する1本鎖核酸を捕獲することによっても、反応液中から変  
10 异核酸のみを選択的に取り出して、容易かつ確実に変異核酸を濃縮することができるを見い出した。

即ち、正常核酸とわずかに変異した核酸が微量混在している検体を增幅すると共に、この増幅物に固相担体に結合可能な2種類の標識物を導入して標識試料核酸とし、一方、正常核酸を増幅して標準核酸とし、この標準核酸を上記標識試料核酸に等モル以上添加・混合して非常に緩やかな温度勾配によりコンペティティブハイブリダイゼーションを行うと、ハイブリダイゼーション後の反応液中に含まれる上記標識物を有する正常核酸の核酸鎖は、標準核酸の核酸鎖（正常核酸から増幅反応により得られた核酸鎖）と完全に相補的な塩基配列を持つことになり、これと二本鎖を形成する。このため、変異核酸に由来するものはこの条件では上記標準核酸の核酸鎖よりも、元の相補鎖（固相担体と結合可能な標識物を持つ核酸鎖）と優先的に二本鎖を形成する。従って、標識試料核酸中の正常核酸は、標識物を持たない上記標準核酸と相補鎖の置換が生じて、いずれか一方の標識物のみを有する二本鎖を形成し、標識試料核酸中の変異核酸は、上記標準核酸との間で相補鎖の置換が生じずに、2種類の標識物を有する元の二本鎖のままとなり、更に残存する標準核酸は、標識物を有さない元の二本鎖のままとなる。そして、この反応液の中からまず上記一方の標識物と選択的に結合する第1の固相担体を

用いて一方の標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を捕獲し、更にこの捕獲したハイブリダイゼーション生成物の中から上記他方の標識物と選択的に結合する第2の固相担体を用いて他方の標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を捕獲することにより、  
5 上記2種類の標識物の両方を有するハイブリダイゼーション生成物、即ち上記コンペティティブハイブリダイゼーションで標準核酸と相補鎖の置換が生じなかった変異核酸が選択的に取り出され、結果として、変異核酸を濃縮することができるものである。なお、第1の固相担体で捕獲したハイブリダイゼーション生成物を第1の固相担体から分離・回収する際、二本鎖のハイブリダイゼーション生成物を変性させて固相担体との結合に関与していない側の一本鎖核酸を分離・回収し、これを更に上記第2の固相担体にトラップして、上記2種類の標識物の両方を有するハイブリダイゼーション生成物由來の一本鎖核酸を捕獲するようにしてもよく、このように目的核酸  
10 中の変異核酸を一本鎖核酸として濃縮した後、この一本鎖核酸をプライマー等を用いて増幅することにより、二本鎖核酸とすることが可能である。  
15

この場合、この第2の方法においても、上記一連の濃縮操作或いは上記コンペティティブハイブリダイゼーション以降の操作を2回以上繰り返すことにより、検体中に含まれる変異核酸が極微量であっても、変異核酸のみを選択的に濃縮して検出可能な濃度にまで確実に濃縮することが可能であり、また、遺伝子の欠失、付加或いは置換等変異の領域が極めて小さく、遺伝子発現のレベルに差が見られないような場合でも、その遺伝子を選択的かつ確実に濃縮することができ、更に目的核酸が二本鎖のDNAの場合に限られず、一本鎖DNA、一本鎖若しくは二本鎖のRNAの場合でも使用することができ、DNAの変異だけでなく、細胞内のmRNA (messenger RNA) の異常の検出、更には、mRNAに対する染色体DNAの異常の検出にも幅広く適応することができるものである。

従って、本発明は、第2の発明として、目的核酸の特定領域の変異核酸を選択的に濃縮する方法であって、

下記工程（1'）～（4'）

（1'）目的核酸の特定領域を増幅すると共に、該増幅物に固相担体と結合可能な2種類の標識物を導入して標識試料核酸を調製する工程、

（2'）目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する標準核酸を、標識試料核酸に対して等モル以上添加・混合し、コンペティティブハイブリダイゼーションを行う工程、

（3'）コンペティティブハイブリダイゼーション後の反応液を一方の標識物と選択的に結合する第1の固相担体にトラップさせて、該一方の標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を捕獲する工程、

（4'）上記（3'）工程で捕獲したハイブリダイゼーション生成物を他方の標識物と選択的に結合する第2の固相担体にトラップさせて、上記両標識物を有するハイブリダイゼーション生成物又はこのハイブリダイゼーション生成物由来の一本鎖核酸を捕獲する工程、からなる一連の工程を1サイクルとし、該サイクルを1回若しくは複数回繰り返すか、又は上記サイクルを1回行った後、上記工程（2'）～（4'）を1回若しくは複数回繰り返すことを特徴とする変異核酸の濃縮方法を提供する。

また、この第2の濃縮方法を実施するための濃縮用検査セットとして、変異核酸の濃縮を行うための検査セットであって、目的核酸の特定領域を増幅すると共に、該増幅物に2種類の標識物を導入して標識試料核酸を調製するための標識試料核酸増幅用試薬と、

目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する標準核酸と、

上記一方の標識物と結合可能な部位を有する第1の固相担体と、

上記他方の標識物と結合可能な部位を有する第2の固相担体とを具備してなることを特徴とする核酸濃縮用検査セットを提供する。

なお、上記第1及び第2の濃縮方法並びにこれら濃縮方法を実施するための上記検査セットにおいて、上記標準核酸における「目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する核酸」は、目的核酸が二本鎖DNAである場合には、該DNAの二本鎖の一方の核酸鎖の正常な塩基配列と相補な塩基配列を有する一本鎖核酸、又は該二本鎖の正常な塩基配列とそれ相補な一对の核酸鎖からなる二本鎖核酸のいずれであってもよい。

10 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明につき詳しく説明する。

本発明の変異核酸の濃縮方法は、上述のように、目的核酸の特定領域の変異核酸を選択的に濃縮する方法であり、まず上記第1の方法は、(1)目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製する工程、(2)該試料核酸と標識標準核酸とをコンペティティブハイブリダイゼーションする工程、及び(3)コンペティティブハイブリダイゼーション反応液から標識物を利用して正常核酸由来のコンペティティブハイブリダイゼーション生成物及び残存標識標準核酸を分離・除去する工程とからなるものである。

20 上記工程(1)における目的核酸は、通常生体から分離した検体から得られるものであり、この場合検体としては、ヒトより得られる血液、組織病片等、或いは糞尿などの排泄物等が挙げられる。更に出生前診断を行う場合には、羊水中に存在する胎児の細胞や試験管中の分裂卵細胞の一部を検体とすることもできる。また、これらの検体は直接、又は必要に応じて遠心分離操作等により沈査として濃縮した後、例えば酵素処理、熱処理、界面活性剤処理、超音波処理、或いはこれらの組み合わせ等による細胞破壊処理を予め施したものを使用することができる。この場合、前記細胞破壊処理は、目的とする組織由来のDNA或いはRNAを顕在化する目的で行わ

れるものである。なお、具体的な方法はPCRプロトコルス、アカデミック プレス インク P14、P352(1990) (PCR PROTOCOLS, Academic Press Inc., P14, P352(1990)) 等の文献に記載された公知の方法  
5 に従って行うことができ、また検体中のDNA又はRNAはトータル量で1～100μg程度であることが望ましいが、1μg以下でも十分増幅可能である。そして、得られたDNAを適当な制限酵素で切断し、決まった末端を持った特定領域のDNA断片を得る。この場合、目的核酸がmRNAである場合には逆転写酵素によりcDNA  
10 (complementary DNA) とし、これを制限酵素で切断する。

次に、上記DNA断片につき、固相担体と結合可能な標識物を有しないプライマーを用いて遺伝子増幅を行い、試料核酸を調製する。  
この場合、上記DNA断片の両末端にそれぞれ上記プライマーの塩  
15 基配列と相補的な塩基配列のリンカーをつないでテンプレートとしておくことができる。なお、上記プライマーとしては、特に制限されず、通常遺伝子増幅に使用されるオリゴヌクレオチドを用いることができ、このオリゴヌクレオチドの5'末端にアミノアルキル基を導入したものを使用することもできる。

20 また、上記工程(2)で用いる標識標準核酸は、上記工程(1)におけるプライマーと同じ塩基配列を有するプライマー本体に固相担体に結合可能な標識物を導入したプライマーを用いて正常細胞に由来するテンプレートや確定されたDNA標品を増幅し、調製することができる。この場合、上記プライマー中の標識物の位置はプライマーの伸長反応の効率に大きく影響を与えないところであればよく、好ましくは5'末端付近の水酸基部分、塩基部分或いはリン酸ジエステル部分の活性基が挙げられ、固相担体に結合可能な標識物は固相担体の性質、或いは固相担体を修飾する物質の特性により選択することができる。

この場合、プライマーのオリゴヌクレオチドに導入する上記標識物は、上記工程（3）において固相担体を結合させて不要なDNAを分離・除去するためのもので、該標識物と、それに結合し得る固相担体上の物質の組み合わせは、例えばビオチンとストレプトアビジン或いはアビジン、ハプテンと抗体、リガンドとレセプター、特定の核酸とそれに結合するDNA結合蛋白などの組み合わせが挙げられる。これらのうち、一般的にはオリゴヌクレオチドの方に、熱に対して安定性の高く、分子の大きさの小さいものを用いることが好ましい。例えば、ビオチンとストレプトアビジンの場合にはオリゴヌクレオチドにビオチン標識を施し、固相担体にストレプトアビジンを結合させておくことが好ましく、オリゴヌクレオチドはビオチンとストレプトアビジンの結合によって固相担体に結合する。また、上記ハプテンとしては2,4-ジニトロフェニル基を有する化合物や、ジゴキシゲニンを使うことができ、更には上述のビオチン或いはフェニルチオイソシアネートなどの蛍光物質等もハプテンとして使用することができる。これらビオチン、ハプテン、及びリガンド等の標識物は、いずれも単独、或いは必要があれば複数種の組み合わせで公知の手段（特開昭59-93099号、同59-148798号、同59-204200号各公報参照）により、導入することができる。なお、固相担体は、上記標識物と結合する部位を導入したウェルやマグネットビーズなどを用いることができ、この場合マグネットビーズは、反応液中に投入して核酸と結合させ、これを磁石を用いて反応液中から回収することができる。

検体を固相担体に結合可能な標識物を持たないプライマーで増幅する場合、及び標識標準核酸を固相担体に結合可能な標識物を持つプライマーで増幅する場合、プライマーの伸長反応に基づく遺伝子増幅反応を行うことができる。この際の遺伝子増幅法としては、公知のPCR (Polymerase Chain Reaction) 法、LCR (Ligase Chain Reaction) 法、

3 S R (Self-sustained Sequence Replication) 法、SDA (Strand Displacement Amplification) 法等が用いられ (Manak, DNA Probes 2nd Edition p255~291, Stockton Press (1993))、特に、PCR法が好適である。

この場合、プライマーの伸長反応は、4種類のヌクレオチド三リン酸 [デオキシアデノシン三リン酸 (dATP)、デオキシグアノシン三リン酸 (dGTP)、デオキシシチジン三リン酸 (dCTP) 及びデオキシチミジン三リン酸 (dTTP) (これらの混合物を dNTP といふこともある)] を基質として該プライマーに取り込ませることにより行われる。

この伸長反応を行う場合、通常核酸鎖を増幅するために上記ヌクレオチド三リン酸、及び核酸伸長酵素を含む増幅反応試薬が用いられ、この場合核酸伸長酵素としては *E. coli* DNAポリメラーゼ I、*E. coli* DNAポリメラーゼ I のクレノウ断片、T4 DNAポリメラーゼなどの任意のDNAポリメラーゼを用いることができるが、特に Taq DNAポリメラーゼ、Tth DNAポリメラーゼ、Vent DNAポリメラーゼ等の熱安定性DNAポリメラーゼを用いることが望ましく、これによりサイクル毎にあらたな酵素の添加の必要性がなくなり自動的にサイクルを繰り返すことが可能となり、更にアリーリング温度を50~60°Cに設定することが可能なためプライマーによる標的配列認識の特異性を高めることができ、迅速かつ特異的に遺伝子増幅反応を行うことができる (詳細については特開平1-314965号、同1-252300号公報参照)。

また、この反応を行う際に、反応溶液の水分の蒸発を防止するためにオイルを添加することができる。この場合、このオイルは水と分配可能で、かつ水よりも比重の軽いものであれば何れのものも使用することができ、具体的にはシリコーンオイル、ミネラルオイル

等が例示される。また、遺伝子増幅装置によってはこのようなオイルを必要としないものもあり、このような遺伝子増幅装置を用いてプライマーの伸長反応を行うこともできる。

このように、上記核酸増幅用プライマーを用いて伸長反応を繰り返すことにより、核酸を効率よく増幅して試料核酸及び標識標準核酸を調製することができる。なお、この遺伝子増幅反応を行う具体的な条件等については実験医学、羊土社、8, No. 9 (1990)、PCRテクノロジー ストックトン プレス (1989) (PCR Technology, Stockton press (1989)) 等の文献に記載された公知の方法に従って行うことができる。

更に、試料核酸については、このようにして増幅したDNAを宿主／ベクター系、即ちプラスミドベクター、ファージベクター、又はプラスミドとファージのキメラベクターから選ばれるベクターに組み込み、大腸菌 (*Escherichia coli*)、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) 等の細菌或いは酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) などの増殖可能な任意の宿主に導入して大量に調製することもできる（遺伝子クローニング）。

また、標識標準核酸については、遺伝子増幅を利用しないで天然の遺伝子から制限酵素により酵素的に直接切り出してもよく、更には、正常核酸を増幅したものを上記試料核酸の場合と同様に遺伝子クローニングにより、大量に調製することもでき、場合によっては化学合成によって調製することも可能である。化学合成としては、トリエステル法、亜リン酸法等が挙げられ、これらは液相法又は不溶性の担体を使った固相合成法などにより自動合成機により一本鎖のDNAを大量に調製することができ、その後アニーリングを行うことによって二本鎖DNAを調製することができる。

また、本発明における目的核酸は、必ずしもDNAである必要はなく、RNAであってもよい。この場合、RNAとしては、tRNA

(transfer RNA)、mRNA (messenger RNA)、rRNA (ribosomal RNA) が挙げられるが、特に DNA の遺伝情報を読み取って遺伝情報を伝える mRNA が対象として好適である。mRNA を目的核酸とする場合には、その塩基配列はインtronを含まない、エキソン（遺伝情報を指定する部分）のみからなるので、その変異の検出・同定は直接遺伝情報を発現する異常を見出すことができる点において意義がある。即ち、DNA は遺伝子の基本設計図であるが、これのみから発現形質を 100 % 推定できるとは限らず、1 つの遺伝子（一種類の転写産物 pre-mRNA）から選択的スプライシング（alternative splicing）によって複数の mRNA（つまり複数のタンパク質）が作られることがある、また pre-mRNA → mRNA の過程で一部ヌクレオチドが加えられたり減らされたりする現象（RNA editing）が起きることがある。従って、制御遺伝子やプロモーター領域の変異、又は組織特異的な発現を解析するには、DNA ではなく mRNA を解析しなければならないが、この場合本発明の濃縮方法は、目的核酸として mRNA を用いることにより、良好にこの変異 mRNA を濃縮することができ、mRNA の解析に大きく寄与するものである。なお、目的核酸として mRNA を用いる場合には、この mRNA をそのまま增幅して試料核酸とすることもできるが、通常は上述したように、逆転写酵素（Reverse Transcriptase）を反応させて mRNA を cDNA とした後 PCR 法により増幅する方法（RT - PCR 法）により得られた DNA を試料核酸として用いることが好ましい。

更に、本発明においては、試料核酸或いは標識標準核酸の一方を一本鎖 DNA 又は一本鎖 RNA とすることも可能である。ここで、上記一本鎖 RNA の調製方法としては化学合成の他には SP6、或いは T7などのファージの RNA ポリメラーゼを用いる試験管内の転写反応によって調製することができる。また、一本鎖 DNA は

上記と同様の化学合成により調製してもよく、また一本鎖DNAを調製することが可能なM13ファージなどのファージDNA或いはファージプラスミドDNAに組み込み、クローニングにより調製することができる。

5 なお、標識標準核酸としてRNAを用いる場合及びプライマーを用いる以外の方法でDNAの増幅を行う場合も、固相担体に結合可能な標識物は上記と同様の標識物とすることができる、上記標識物を公知の方法に従って化学的或いは酵素的に導入することができる（特開平1-252300号、特開平1-63393号公報等参照）。

10 次に、上記遺伝子増幅の結果、目的核酸から得られた固相担体に結合可能な標識物を持たないDNA又はRNAを試料核酸とし、標品から調製した固相担体に結合可能な標識物を持つDNA又はRNAを標識標準核酸として、試料核酸に標識標準核酸を等モル以上加え、コンペティティブハイブリダイゼーションを行う。

15 この場合、上記標識標準核酸は上記試料核酸と両末端とも等しい塩基配列の二本鎖DNAであることが理想的であるが、必ずしも両末端の塩基配列が完全に等しいものでなくともよく、その目安としては、試料DNAと標準DNAの鎖長の違いは両末端でそれぞれ10塩基以内程度であれば良好に濃縮を行うことができる。なお、試料核酸或いは標識標準核酸の一方を一本鎖DNA又は一本鎖RNAとする場合には試料核酸と標識標準核酸との鎖長の違いに特に制限はない。

20 本発明の変異核酸の濃縮方法においては、目的核酸がDNA若しくはRNAであるかにより、試料核酸と標識標準核酸のコンペティティブハイブリダイゼーションを行う際の組み合わせがDNA-DNAハイブリッド、DNA-RNAハイブリッド、RNA-RNAハイブリッドの3種類が考えられ、これらのいずれの組み合わせにおいても変異DNA又は変異RNAを効果的に濃縮することができるものである。特に、目的核酸がRNAの場合には、上述のように、細

胞内の特定mRNAの検出及びmRNAに対する染色体DNAの検出に優れた効果を發揮することができる。

コンペティティブハイブリダイゼーションの際には、まず上記試料核酸と標識標準核酸とを変性する必要があるが、この変性は熱による方法或いはアルカリによる方法が好ましい。また、両核酸を混合する時期は変性直前でもよいし、変性後でもよい。ここで、本発明においては、試料核酸に対して標識標準核酸を等モル以上加える必要があり、通常は10～50倍モル程度に過剰に加えることが好ましいが、核酸の鎖長、塩基配列及び変異の程度に応じて最適条件は異なる。

また、コンペティティブハイブリダイゼーションにおいては、溶液の組成、特に塩濃度を核酸の鎖長に応じて最適になるように調整する必要がある。この場合ハイブリダイゼーションにおいては、一般に塩濃度の調整に、SSC (20×SSC : 3M 塩化ナトリウム、0.3N クエン酸ナトリウム) やSSPE (20×SSPE : 3.6M 塩化ナトリウム、0.2M リン酸ナトリウム、2mM EDTA) が使われており、本発明の濃縮方法でもこれらの溶液を好適な濃度に希釈して使用することができる。また、必要に応じてジメチルスルフォキシド (DMSO) 、ジメチルフルムアミド (DMF) などの有機溶媒を添加することもできる。

コンペティティブハイブリダイゼーションは、上記の方法で変性した試料核酸に標識標準核酸を等モル以上添加・混合し、高温から徐々に温度を下げることで達成することが可能である。この際の温度条件については、ハイブリダイゼーションを行う核酸の鎖長や塩基配列及び、標識標準核酸と試料核酸との間における変異の種類、程度によって適宜最適条件が設定されるが、通常は98～58℃までの範囲で3～10分間に1℃の速度、より好ましくは98～70℃までの範囲で10分間に1℃の速度で温度を下げる条件とすることが好適である。

次に、コンペティティブハイブリダイゼーション生成物について、  
標識標準核酸に存在する固相担体に結合可能な標識物を用いて、残  
存する標識標準核酸及び標識標準核酸とハイブリダイズした試料核  
酸を固相担体とトラップさせることによって固相担体に結合させて、  
5 分離・除去する。なお、上記操作は1回以上、好ましくは3回程度  
繰り返すことが好ましく、これにより残存する標識標準核酸及び標  
識標準核酸とハイブリダイズした試料核酸を確実に固相担体に結合  
させて、分離・除去することができる。

この場合、標識標準核酸が有する固相担体に結合可能な標識物が  
10 ビオチンであり、固相担体がストレプトアビジンを固定化したマイ  
クロタイターウェルの場合には、コンペティティブハイブリダイゼー  
ション生成物をウェルに加え、25℃或いは室温で15～30分間  
程度振盪反応させればよいが、標識物及び固相担体の種類によって  
はこれらの条件は異なる。

15 これらの操作により、固相担体に結合しなかった画分、即ち反応  
残液には、元の検体に比べて標識標準核酸と二本鎖形成しなかった  
もの、即ち標識標準核酸と異なる塩基配列を持つものが高い割合で  
含まれていることになる。この際に、元の検体中に含まれていた変  
異核酸の含量が極微量である場合には、一度の上記濃縮操作では検  
出限界にまで達しないことがあり、この場合には、上記一連の濃縮  
20 操作を2回以上繰り返すことにより、変異核酸を段階的に濃縮し、  
検出可能な濃度にまで確実に濃縮することが可能である。この場合、  
2回目以降の濃縮操作は、目的核酸の增幅操作から全工程を繰り返  
すことにより濃縮する変異核酸の絶対量を増大することができるが、  
25 必ずしも全工程を繰り返す必要はなく、濃縮操作としては上記コン  
ペティティブハイブリダイゼーション以降の操作のみを繰り返すこ  
とによっても濃縮率を高めることができる。

次に、第2の発明にかかる濃縮方法は、(1') 2種類の標識物  
で標識した標識試料核酸を調製する工程、(2') 該標識試料核酸

と非標識の標準核酸とをコンペティティブハイブリダイゼーションする工程、(3')コンペティティブハイブリダイゼーション反応液から上記2種類の標識物の少なくとも一方を有するハイブリダイゼーション生成物を捕獲する工程、及び(4')捕獲したハイブリダイゼーション生成物から2種類の標識物を両方有するハイブリダイゼーション生成物又はこのハイブリダイゼーション生成物由来の一本鎖核酸を捕獲して変異核酸を選択的に取り出す工程からなるものである。即ち、この第2の方法は、上記第1の方法とは逆に、2種類の標識物で標識した標識試料核酸と非標識の標準核酸とでコンペティティブハイブリダイゼーションを行い、上記2種類の標識物を利用して試料核酸中の変異核酸のみを分離・捕獲することにより、変異核酸を濃縮するものである。

上記(1')の標識試料核酸を調製する工程は、検体から得られた目的核酸を上記第1の方法の場合と同様にして増幅することにより調製することができ、この場合この第2の方法においては、この試料核酸中に2種類の標識物を導入して標識試料核酸とするものである。この標識物を導入する方法としては、上記第1の方法における標識標準核酸を調製する場合と同様の方法によることができ、具体的には標識物を導入したプライマーを用いてPCR法により目的核酸を増幅する方法が好ましく採用され、この場合この第2の方法にあっては、2種類のプライマーにそれぞれ異なる標識物を導入して、異なる標識物を有する2種類のプライマーを調製し、この2種類のプライマーを用いて目的核酸を増幅することにより、2種類の標識物が導入された標識試料核酸を調製するものである。なお、目的核酸の前処理やPCR法による増幅の条件等は、上記第1の方法と同様に行うことができる。

ここで、上記標識試料核酸に導入される2種類の標識物は互いに異なるものであればいずれのものでもよく、上記第1の方法における標識試料核酸に導入される標識物と同様のものを用いることがで

きるが、特に結合部位との結合特異性の高いものが好ましく使用され、例えばビオチンとハプテンとの組み合わせが好ましく用いられる。

なお、この標識試料核酸は、上記第1の濃縮方法の場合と同様に、  
5 プライマーを用いずに、プラスミドベクター、ファージベクター、  
又はプラスミドとファージとのキメラベクターから選ばれる宿主／  
ベクター系により増幅して調製することも可能であり、この場合上  
記2種類の標識物は、目的核酸の増幅を行った後、公知の方法に従  
って化学的或いは酵素的に導入することができる。

10 また、上記(2')工程で用いられる標準核酸は、標識物を導入  
しないこと以外は、上記第1の方法における標識標準核酸の場合と  
同様にして得ることができ、また上記標識試料核酸と標準核酸との  
コンペティティブハイブリダイゼーションも上記第1の方法における  
コンペティティブハイブリダイゼーションと同様に行うことができる。  
15

そして、この第2の方法では、上記(3')及び(4')の工程  
により、このハイブリダイゼーション反応液中から変異核酸を選択  
的に分離・捕獲するものである。即ち、まず得られたハイブリダイ  
ゼーション反応液を上記2種類の標識物のうちの一方の標識物と選  
択的に結合する第1の固相担体にトラップして、少なくとも一方の  
標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を捕獲する。この操  
作により捕獲されるハイブリダイゼーション生成物は、標準核酸と  
標識試料核酸中の正常核酸とがハイブリダイズした一方の標識物の  
みを有するもの、及び標準核酸とハイブリダイズせずに元のままの  
25 2本鎖からなる2種類の標識物を有する変異核酸とが含まれている。  
ついで、この捕獲したハイブリダイゼーション生成物を上記2種類  
の標識物のうちの他方の標識物と選択的に結合する第2の固相担体  
にトラップして、他方の標識物を有するハイブリダイゼーション生  
成物を捕獲する。この操作により捕獲されるハイブリダイゼショ

ン生成物は、上記第1の固相担体で捕獲した一方の標識物を有するハイブリダイゼーション生成物のうち、更に他方の標識物を有するもの、即ち両方の標識物を有する変異核酸が分離・捕獲され、変異核酸を濃縮することができるものである。

この場合、上記第1及び第2の固相担体は、それぞれ上記第1の方法の場合と同様に調製することができ、この場合標識物が結合する結合部位としては、上記標識試料核酸に導入した2種類の標識物に応じて、各標識物と選択的に結合するものが用いられ、上記第1の方法で説明したものと同様のものを使用することができる。例えば、2種類の標識物としてビオチンとハプテンとを用いた場合には、ビオチンと選択的に結合するものとしてストレプトアビジン又はアビジンが用いられ、ハプテンと選択的に結合するものとしてその抗体が用いられる。また、固相担体に捕獲したハイブリダイゼーション生成物を固相担体から分離・回収する方法は、用いた標識物と固相担体の結合部位との種類に応じて、適宜公知の方法に従って行うことができる。この場合、第1の固相担体で捕獲したハイブリダイゼーション生成物は、通常は二本鎖核酸のまま固相担体から分離回収して第2の固相担体に供するが、例えば単に変異核酸を検出するために濃縮を行う場合などには、二本鎖を分離して固相担体との結合に関与していない側の一本鎖のみを分離回収して、第2の固相担体に供することもできる。この場合、変異核酸は一本鎖核酸として濃縮されるが、これをプライマー等を用いて増幅することにより、容易に二本鎖核酸とすることができます。また、このように一本鎖核酸として濃縮する場合には、第2の標識物と結合する部位を導入したマグネットビーズを第2の固相担体として用いることができ、このマグネットビーズを磁石を用いて反応液中から回収する方法が好適に採用される。

なお、この第2の濃縮方法において、上述した以外の操作については、上記第1の濃縮方法と同様にして行うことができる。また、

この第2の濃縮方法においても、一連の工程或いはコンペティティブハイブリダイゼーション以降の工程を2回以上繰り返して、濃縮度を向上させることができる。

これら本発明にかかる両濃縮方法によれば、得られた濃縮処理液から変異核酸の検出を行うことにより、従来法では困難であった検体中に微量に含まれる変異核酸の検出を容易かつ確実に行うことができる。更に、このような変異核酸の含まれる割合を高めることによってこの変異核酸の単離を容易とし、その変異核酸の構造及び機能を容易に解析することができる。即ち、物理学的な分析、例えばヌクレオチドの塩基配列のような遺伝子構造を決定し、遺伝子操作、更には遺伝病の解析により遺伝子治療へと発展させることが可能となるものである。

ここで、本発明の濃縮方法により濃縮液から変異核酸を検出する方法としては、公知の方法を用いることができ、例えば、ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動による検出法や検出可能な標識物を結合させたプローブを用いる検出法などが好適に使用し得る。この場合、検出可能な標識物としては、非放射性、放射性物質のどちらを用いてもよいが、好ましくは非放射性物質が用いられる。標識物として用いられる非放射性物質としては、直接標識可能なものとして蛍光物質〔例えばフルオレッセイン誘導体（フルオレッセインイソチオシアネート等）、ローダミン及びその誘導体（テトラメチルローダミンイソチオシアネート等）〕、化学発光物質（例えばアクリジン等）や遅延蛍光を発する物質（D T T A：ファルマシア社製）などが挙げられる。

また、特定遺伝子の機能やその遺伝子から翻訳されるタンパク質の機能等を解明するために特定核酸に人为的に変異を起こさせた既知の変異核酸が必要となる場合があるが、本発明の濃縮方法は、特定核酸に人为的に核酸の変異を起こさせた後、変異した核酸を選択的に濃縮することができ、効率よく変異核酸を調製することができ

る。即ち、特定核酸に亜硫酸などの変異誘起物質を作用させて人為的に変異を起こさせた後、これら混合物中の特定核酸を目的核酸とすると共に、変異前の核酸をから標識又は非標識の標準核酸を調製して、上記本発明の濃縮操作を繰り返すことにより、変異した核酸を選択的に濃縮・回収することができ、変異核酸の調製を効率よく行うことができるものである。

次に、本発明の核酸の濃縮用検査セットは、上記本発明の変異核酸の濃縮方法に従って、容易かつ確実に変異核酸を濃縮するための検査セットであり、上記第1の濃縮方法を実施するためのセットは、目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製するための試料核酸増幅用試薬と、目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する核酸に固相担体と結合可能な標識物を導入した標識標準核酸と、上記標識物と結合可能な部位を有する固相担体とを具備してなるものである。

この検査セットは、上記第1の濃縮方法に従って、細胞破壊等の前処理を施した検体中の目的核酸又は必要により合成した目的核酸を上記試料核酸増幅用試薬を用いて増幅することにより試料核酸を調製し、これに固相担体に結合可能な標識物を持つ上記標識標準核酸を加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行った後、得られたハイブリダイゼーション生成物を固相担体にトラップして標識標準核酸とハイブリダイズしたものと分離・除去するものである。

この場合、試料核酸を調製する上記試料核酸増幅用試薬としては、上記第1の濃縮方法で説明した標識物を有さないプライマーやファージDNA、ファージプラスミドDNA或いは、RNA調製用としてはRNAポリメラーゼ等を用いることができるが、通常は上記プライマーが好適に用いられる。また、核酸の増幅やハイブリダイゼーション等を行う際の試薬類及び上記固相担体としては、公知のもの、具体的には上記本発明の濃縮方法で説明したものと同様のものを使

用することができ、更に、上記本発明の濃縮方法で説明した検体前処理用の細胞破壊試薬、反応溶液の水分の蒸発を防止するためのオイル及び固相担体に結合させた後、固相担体に結合しなかった核酸等を洗浄するための洗浄液等を用いることができ、これらと組み合わせて本発明の核酸濃縮用検査セットとすることもできる。

ここで、上記標識標準核酸は、上記本発明の濃縮方法で説明した方法で調製した標識物を有するDNAを用いることができる。また、この標識標準核酸に代えて、標識標準核酸を調製するための目的核酸の特定領域を増幅可能なプライマーに固相担体に結合可能な標識物を導入したプライマーを含む標識標準核酸増幅用試薬を用いて本発明の濃縮用検査セットを構成することもでき、濃縮を行う際にこの標識標準核酸増幅用試薬を用いて上記濃縮方法で説明した方法により、その都度、標識標準核酸を調製するようにしてもよい。

また、上記第2の濃縮方法を実施するための検査セットは、目的核酸の特定領域を増幅すると共に、該増幅物に2種類の標識物を導入して標識試料核酸を調製するための標識試料核酸増幅用試薬と、目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する標準核酸と、上記一方の標識物と結合可能な部位を有する第1の固相担体と、上記他方の標識物と結合可能な部位を有する第2の固相担体とを具備してなるものである。

この検査セットは、上記第2の濃縮方法に従って、細胞破壊等の前処理を施した検体中の目的核酸又は必要により合成した目的核酸を上記標識試料核酸増幅用試薬を用いて増幅することにより2種類の標識物で標識された標識試料核酸を調製し、これに上記標準核酸を加えてコンペティティブハイブリダイゼーションを行った後、得られたハイブリダイゼーション生成物を第1及び第2の固相担体に順次トラップして標準核酸とハイブリダイズしなかった2種類の標識物を有するハイブリダイゼーション生成物を分離・捕獲するものである。

この場合、試料核酸を調製する上記標識試料核酸増幅用試薬としては、上記第2の濃縮方法で説明したそれぞれ異なる標識物を有する2種類のプライマーやファージDNA、ファージプラスミドDNA或いは、RNA調製用としてはRNAポリメラーゼ等を用いること5ができるが、通常は上記2種類のプライマーが好適に用いられる。また、核酸の増幅やハイブリダイゼーション等を行う際の試薬類及び上記固相担体としては、公知のもの、具体的には上記本発明の濃縮方法で説明したものと同様のものを使用することができ、更に、上記本発明の濃縮方法で説明した検体前処理用の細胞破壊試薬、反応溶液の水分の蒸発を防止するためのオイル及び固相担体に結合させた後、固相担体に結合しなかった核酸等を洗浄するための洗浄液、固相担体に結合した核酸を固相担体から分離・回収するための試薬等を用いることができ、これらと組み合わせて本発明の核酸濃縮用検査セットとすることもできる。

ここで、上記標準核酸は、上記本発明の濃縮方法で説明した方法で調製した標識物を有さない非標識のDNAを用いることができる。また、この標準核酸に代えて、標準核酸を調製するための目的核酸の特定領域を増幅可能なプライマーを含む標準核酸増幅用試薬を用いて本発明の濃縮用検査セットを構成することもでき、濃縮を行う20際にこの標準核酸増幅用試薬を用いて上記濃縮方法で説明した方法により、その都度、標準核酸を調製するようにしてもよい。

このように、本発明の変異核酸の濃縮方法によれば、目的核酸の特定領域において、正常核酸とそれとはわずかに異なる塩基配列を有する変異核酸とが混在する検体から、正常核酸を選択的に分離除去し、或いは変異核酸を選択的に分離捕獲することにより、検体中の微量な変異核酸を濃縮することができ、微量な変異核酸の検出を容易かつ確実に行うことができると共に、更にはその同定を可能とするものである。また、特定遺伝子に人为的に突然変異を誘発させた後、変異した遺伝子だけを選択的に濃縮することができ、変異核

酸の調製を効率よく行うこともできる。

また、本発明によれば、遺伝病や癌などの原因となる遺伝子が不明な場合に、その候補となる遺伝子を効率よく濃縮することが可能である。この場合、標準核酸を正常な人あるいは組織に由来する染色体DNAあるいはmRNAから調製し、試料核酸を該疾病を有する患者又は癌組織から調製することができる。標準核酸及び試料核酸の増幅は、染色体DNAの場合は直接、mRNAの場合は逆転写により二本鎖DNAとした後、任意の制限酵素で切断してリンカーを付加し、該リンカー配列と相補的なプライマーを用いて本発明の方法により濃縮を行えば、正常な人あるいは組織と該疾病を有する患者又は癌組織との間で塩基配列の異なる遺伝子群を選択的に得ることができる。

更に、本発明の濃縮用検査セットによれば、上記本発明の変異核酸の濃縮方法にしたがって、変異核酸を選択的に濃縮し、検出や同定操作に供することができる。

従って、本発明によれば十分量の変異核酸を確実に得ることができ、それを用いて変異核酸の構造や機能を解析することにより遺伝病の解明、遺伝子治療に大きく貢献できるものである。

以下、実施例を示し本発明を具体的に説明するが、本発明は下記実施例に制限されるものではない。

#### (実施例1)

ヒトc-H-ras遺伝子についてその正常遺伝子と変異遺伝子とが共存する検体から変異遺伝子を選択的に濃縮する方法について、以下に説明する。

正常遺伝子として、ヒトc-H-ras遺伝子、変異遺伝子としてヒトc-H-ras遺伝子の12番目のコドンがGGC(Gly)→GTC(Val)の変異を起こしたもの用いた。

#### 遺伝子増幅

PCR法によるDNAの増幅は、下記pSK-2(正常遺伝子を

含むプラスミド) 或いは p K Y - 1 (変異遺伝子を含むプラスミド) をそれぞれ 1 n g をテンプレートとし、下記プライマー - N H<sub>2</sub> - P H R - 1、N H<sub>2</sub> - C H R A S - 1 をそれぞれ 1 0 0 n g 用いて、各 2 0 0 μM の d A T P, d G T P, d C T P, d T T P 存在下、1 0 0 μ 5 1 のトリス - 塩酸緩衝液 (p H 8. 8), 1 6. 6 mM (N H<sub>2</sub>)<sub>2</sub> S O<sub>4</sub>、6. 7 mM M g C l<sub>2</sub>、1 0 mM の 2 - メルカプトエタノール及び 2 U n i t の T t h D N A ポリメラーゼを含む溶液中で行った。

反応は 9 4 °C で 1 0 分間加熱後、9 4 °C, 3 0 秒、6 0 °C, 3 0 秒、7 2 °C, 6 0 秒のサイクルで 3 0 回繰り返した。この反応液を 10 アガロースゲル電気泳動にかけ、增幅物のサイズと増幅率を確認した。

N H<sub>2</sub> - P H R - 1

N H<sub>2</sub> - 5' A T G A C G G A A T A T A A G C T G G T G 3'

N H<sub>2</sub> - C H R A S - 1

15 N H<sub>2</sub> - 5' C T G G A T G G T C A G C G C A C T C T T 3'  
p S K - 2

正常 r a s 遺伝子を持つプラスミド (T. Sekiya, Gann, 7 4, 7 9 4 (1 9 8 3), J C R B (Japan Cancer Research Resources Banks)) より入手可  
20 p K Y - 1

1 2 番目のコドンに変異のあるプラスミド (M. H. Kraus and Y. Yuasa, Nature, 3 0 3, 7 7 5 (1 9 8 3), J C R B (Japan Cancer Research Resources Banks)) より入手可

#### 被検試料の調製

次に、正常遺伝子に由来する増幅物と変異遺伝子に由来する増幅物を表 1 に示した割合に混合し、正常遺伝子に対して変異遺伝子の割合が 0 %、1 0 %、5 0 %、1 0 0 %となるようにサンプルを調製した。これらサンプルを蒸留水で 1 0 0 0 倍に希釈して被検試料

とした。

表-1

変異遺伝子の割合	正常遺伝子由来增幅物	変異遺伝子由来增幅物
0 %	100 μl	0 μl
10 %	90 μl	10 μl
50 %	50 μl	50 μl
100 %	0 μl	100 μl

#### 10 ビオチン化正常遺伝子の調製

上記 pSK-2 (正常遺伝子を含むプラスミド) をテンプレートとし、5'末端に固相担体に結合可能な標識物としてビオチンを導入した下記プライマー Bi o - P H R - 1、Bi o - C H R A S - 1をそれぞれ 100 ng 用いて、上記と同様の条件で PCR 法により遺伝子増幅を行い、得られた増幅物をアガロースゲル電気泳動にかけ、増幅物のサイズと増幅率を確認した。この得られた増幅物をビオチン化正常遺伝子とする。

Bi o - P H R - 1

Bi otin - 5' ATGACGGAAATATAAGCTGGTG 3'

20 Bi o - C H R A S - 1

Bi otin - 5' CTGGATGGTCAGCGCACTCTT 3'

#### 濃縮操作

上記各比率の被検試料各 1 μl に上記プライマー NH<sub>2</sub> - P H R - 1、NH<sub>2</sub> - C H R A S - 1 をそれぞれ 100 ng 用いて、上記と同様の条件で PCR 法により増幅した。この増幅物を蒸留水で 10 倍に希釈し、その 5 μl を取り、これに上記ビオチン化正常遺伝子による遺伝子増幅物 5 μl、10 × SSC (10 × SSC : 0.3 M クエン酸ナトリウム、pH 7.0, 0.3 M 塩化ナトリウム) 10 μl、蒸留水 10 μl を混和した。即ち、被検試料に対して 10 倍

量のビオチン化正常遺伝子増幅物を加えたことになる。この溶液を 98 °C で 10 分間加熱し熱変性を行った後、98 °C から 70 °C まで、10 分間に 1 °C の速度の非常に緩やかな温度勾配により二本鎖形成反応（コンペティティブハイブリダイゼーション）を行った。

- 5 この反応液に T E 緩衝液（10 mM トリス塩酸緩衝液（pH 8.0）、1 mM EDTA）80 μl を加えて希釈し、この液をストレプトアビジン固定化ウェルに添加した。室温で 15 分間振盪後、反応残液を吸引し、この反応残液を新たなウェルに移し、更に室温で 15 分間振盪後、反応残液を吸引し、この反応残液を新たなウェル  
10 に移し、更にもう一度室温で 15 分間振盪した。この反応液 1 μl に上記プライマー-NH<sub>2</sub>-PHR-1、NH<sub>2</sub>-CHRAS-1 をそれぞれ 100 ng 用いて、上記と同様の条件で PCR 法により増幅した。この溶液 10 μl を制限酵素 Hpa II で処理した（制限酵素 Hpa II は正常遺伝子は切断するが変異遺伝子は切断しない）。

15 検出

この反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、生成した DNA 断片を分析し、濃縮操作前のものと比較した。結果を表 2 に示す。

表-2

20

変異遺伝子の割合	濃縮前		濃縮後	
	正常遺伝子	変異遺伝子	正常遺伝子	変異遺伝子
0 %	++	-	++	-
10 %	++	-	+	++
50 %	++	++	-	++
100 %	-	++	-	++

25

++ : バンドがはっきりと検出できた。

+ : 不鮮明ではあるがバンドらしきものが検出できた。

- : バンドが検出できない。

表2の結果から、変異遺伝子を10%含むものでは、濃縮操作を行なう前のものではほとんど見られなかった変異遺伝子に由来する約60bpのバンドがはっきりと観察できた。また、50%の変異遺伝子を含むものでは、操作前でははっきりと観察できた正常遺伝子に由来する約30bpのバンドが濃縮操作後ではほとんど消失し、変異遺伝子に由来する約60bpのバンドがはっきりと確認できた。このことから、本発明の濃縮方法によって、正常遺伝子と変異遺伝子の混合物から選択的に変異遺伝子が濃縮できることが確認できた。  
なお、変異遺伝子の存在比率を更に高める必要がある場合には、上記濃縮までの一連の操作を複数回繰り返せばよい。

#### [実施例2]

膵臓癌細胞を含む膵臓組織から、癌細胞に由来する正常Ki-ras遺伝子と、この正常遺伝子の12番目のコドンがGGT(Gly)からGAT(Asp)の変異を起こした変異Ki-ras遺伝子とが混在する試料からmRNAを抽出し、このmRNAから変異遺伝子を濃縮する方法について、以下に説明する。

#### 試料核酸の調製

膵臓組織からQuick Prep mRNA Purification Kit (Pharmacia社)によりmRNAを抽出した。このmRNAをテンプレートとして逆転写反応を以下の操作により行い、cDNAを調製した。

mRNA 1 $\mu$ mを含む20 $\mu$ lの10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.3), 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.01%ゼラチン、各1mMのdATP, dGTP, dCTP, dTTP, 20unit placental RNase inhibitor存在下、5 $\mu$ gのoligo(dT)<sub>12-18</sub>をプライマーとして100unitのmurine reverse transcriptaseを用いて37°Cで30分間逆転写反応を行い、cDNAを得た(cDNA溶液)。このcDNA溶液を95

℃で5分間加熱して酵素を失活させた。

次に、上記cDNA溶液を用いてPCR反応を以下の手順で行った。

cDNA溶液20μlに、下記プライマー-NH<sub>2</sub>-KRASF、NH<sub>2</sub>-KRASRをそれぞれ10pmol用いて、各200μMのdATP、dTTP、dCTP、dGTPの存在下、80μlの10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.3)、5.0mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、0.01%ゼラチン、及び2unitのTaq DNAポリメラーゼを加え、ミネラルオイルを重層した。この溶液を94℃で5分間加熱後、94℃、30秒、60℃、30秒、72℃、60秒のサイクルを30回繰り返し増幅し、試料核酸を調製した。

#### NH<sub>2</sub>-KRASF

NH<sub>2</sub>-5' AAC T T G T G G T A G T T G G A C C T 3'

#### NH<sub>2</sub>-KRASR

15 NH<sub>2</sub>-5' C T A T T G T T G G A T C A T A T T C G 3'

#### 標識標準核酸の調製

標識標準核酸の調製は下記方法で行った。

正常人の血液500μlからSepaGene(三光純薬製)を用いて染色体DNAを抽出した。このDNAのうち、500ngをテンプレートとして、100μlの10mMトリス-塩酸緩衝液(pH8.3)、5.0mM KCl、1.5mM MgCl<sub>2</sub>、各200μMのdATP、dTTP、dCTP、dGTP存在下、下記プライマー-Bio-KRASF、Bio-KRASRをそれぞれ10pmol用いて、2unitのTaq DNAポリメラーゼを加え、ミネラルオイルを重層した。この溶液を94℃で5分間加熱後、94℃、30秒、60℃、30秒、72℃、60秒のサイクルを30回繰り返し増幅し、標識標準核酸を調製した。

#### Bio-KRASF

Biotin-5' AAC T T G T G G T A G T T G G A C C T 3'

## B i o - K R A S R

B i o t i n - 5' C T A T T G T T G G A T C A T A T T C G 3'

濃縮操作1回目の濃縮操作

上記試料核酸を蒸留水で10倍に希釈し、その $5\mu l$ と、標識標準核酸（ビオチン化正常遺伝子増幅物） $5\mu l$ 、 $10 \times SSC 10\mu l$ 、蒸留水 $10\mu l$ を混和した。即ち、試料核酸に対して10倍量のビオチン化正常遺伝子増幅物を加えたことになる。この溶液を $98^{\circ}C$ で10分間加熱し熱変性を行った後、 $98^{\circ}C$ から $70^{\circ}C$ まで、10分間に $1^{\circ}C$ の速度の非常に緩やかな温度勾配により二本鎖形成反応を行った。この反応液にTE緩衝液 $80\mu l$ を加えて希釈し、この液をストレプトアビジン固定化ウェルに加えた。室温で15分間振盪後、反応残液を吸引し、この反応残液を新たなウェルに移し、更に室温で15分間振盪後、反応残液を吸引し、この反応残液を新たなウェルに移し、更にもう一度室温で15分間振盪した。

得られた反応液 $1\mu l$ に上記プライマー-NH<sub>2</sub>-K R A S F、NH<sub>2</sub>-K R A S Rをそれぞれ $100ng$ 用いて、上記と同様の条件で増幅した。この反応液 $10\mu l$ を制限酵素BstN Iで処理した（制限酵素BstN Iは正常遺伝子は切断するが変異遺伝子は切断しない）。この反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、生成したDNA断片を分析した。次いで、残りの液により下記2回目の濃縮操作を行った。

2回目以降の濃縮操作

上記1回目の濃縮操作後のPCR増幅物を蒸留水で10倍に希釈し、その $5\mu l$ と、標識標準核酸（ビオチン化正常遺伝子増幅物） $5\mu l$ 、 $10 \times SSC 10\mu l$ 、蒸留水 $10\mu l$ を混和した。これを1回目の濃縮操作と同様に熱変性、温度勾配によるアニーリングを行い、同様にPCR増幅後、制限酵素処理を行い、上記と同様に生成したDNA断片を分析した。残りの液を用いて更にもう一度、

同様の濃縮操作を行い、制限酵素処理後、生成したDNA断片を上記と同様に分析した。

各ステップでの変異遺伝子と正常遺伝子の検出に関する結果を表3に示す。

5

表-3

10

	正常遺伝子	変異遺伝子
濃縮操作なし	++	-
濃縮操作1回	++	+
濃縮操作2回	++	+
濃縮操作3回	+	+-

15

++ : バンドがはっきりと検出できた。

+ : 不鮮明であるがバンドらしきものが検出できた。

15

- : バンドが検出できない。

表3の結果から、本発明の濃縮方法によれば、目的核酸がmRNAの場合でも、変異遺伝子を選択的に濃縮することができ、更に濃縮操作を繰り返すことにより、変異遺伝子の存在割合を確実に高め得ることが確認された。

20

### [実施例3]

試料核酸を2種類の標識プライマーを用いて調製した標識試料核酸と、非標識の標準核酸とを用いて変異核酸の濃縮を行う方法について、以下に説明する。

#### 標識試料核酸の調製

25

実施例2と同様に肺臓組織からmRNAを抽出し、これを逆転写してcDNAを得た。このcDNA溶液を用いてPCR反応を以下の手順で行った。

cDNA溶液20μlに、下記プライマーBio-KRASF, DNP-KRASRをそれぞれ10pmol用いて、各200μM

の dATP, dGTP, dCTP, dTTP 存在下、 $80\mu l$  のトリス-塩酸緩衝液 (pH 8.3), 50 mM の KCl, 1.5 mM の MgCl<sub>2</sub>, 0.01% のゼラチン及び 2 ユニットの Taq DNA ポリメラーゼを加え、ミネラルオイルを重層した。この溶液を 94 °C, 30 秒加熱後、94 °C, 30 秒、60 °C, 30 秒、72 °C, 60 秒のサイクルを 30 回繰り返して増幅し、標識試料核酸を調製した。

#### Bio-KRASF

Biotin-5' AACTTGTGGTAGTTGGACCT 3'

#### DNP-KRASR

10 DNP-5' CTATTGTTGGATCATATT CG 3'

#### 標準核酸の調製

標準核酸の調製は下記の方法で行った。

実施例 2 と同様に正常の血液から染色体 DNA を調製し、これを NH<sub>2</sub>-KRASF, NH<sub>2</sub>-KRASR をそれぞれ 10 pmol 用いて、上記試料核酸と同様の条件で増幅し、標準核酸を調製した。

#### NH<sub>2</sub>-KRASF

NH<sub>2</sub>-5' AACTTGTGGTAGTTGGACCT 3'

#### NH<sub>2</sub>-KRASR

NH<sub>2</sub>-5' CTATTGTTGGATCATATT CG 3'

#### 濃縮操作

##### 1回目の濃縮操作

上記標識試料核酸を蒸留水で 100 倍に希釈し、その 5 μl と、上記標準核酸 5 μl, 10 × SSC 10 μl、蒸留水 10 μl を混和した。即ち、標識試料核酸に対して非標識の正常な配列を有する核酸を 100 倍量加えたことになる。この溶液を 98 °C で 10 分間加熱し熱変性を行った後、98 °C から 70 °C まで、10 分間に 1 °C の速度の非常に緩やかな温度勾配により二本鎖形成反応を行った。この反応液に TE 緩衝液 80 μl を加えて希釈し、この液をストレプトアビジン固定化ウェルに加えた。室温で 15 分間振盪後、反応

残液を吸引し、この反応残液を新たなウェルに移し、更に室温で15分間振盪後、反応残液を吸引し、更にウェルを300μlのTE緩衝液で3回洗浄した。

次に、このウェルに10μlの0.01N NaOHを加え、ウェルに吸着した核酸を変性させた。上清を回収し、標識試料核酸中のビオチン標識を持たない側の一本鎖核酸を回収した。この溶液に10μlの0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)、150mM NaCl、1mM EDTAを加えて中和した。

この溶液に家兔抗DNP抗体、羊抗家兔IgG抗体修飾マグネットビーズ(DYNABEADS(商標)M-280 Sheep anti-Rabbit IgG、DYNAL社)を加え、磁石によりDNP標識一本鎖試料核酸／家兔抗DNP抗体／羊抗家兔IgG抗体修飾マグネットビーズ複合体を回収した。これを300μmの0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)、150mM NaCl、1mM EDTAで3回洗った。

上記複合体を30μlの0.1Mトリス-塩酸緩衝液(pH7.0)、150mM NaCl、1mM EDTAに懸濁し、98℃、5分間加熱し、抗体分子を失活させた。磁石によりマグネットビーズを除き、DNP標識一本鎖試料核酸を含む上清を回収した。

得られた上清1μlをプライマーBio-KRASF、DNP-KRASRを用いて、上記標識試料核酸の調製の際と同様の条件でPCR增幅した。この反応液10μlを制限酵素BstNIで処理した(制限酵素BstNIは正常遺伝子は切断するが変異遺伝子は切断しない)。この反応液をポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、生成したDNA断片を分析した。次いで残りの液により、下記2回目以降の濃縮操作を行った。

#### 2回目以降の濃縮操作

上記1回目の濃縮操作後のPCR增幅物を蒸留水で100倍に希釈し、そのうちの5μlと、上記標準核酸5μl、10×SSC10

$\mu$  l、蒸留水 10  $\mu$  lを混和した。これを1回目の濃縮操作と同様に熱変性、温度勾配によるアニーリング、固相担体への吸着を行い、同様にPCR增幅後、制限酵素処理を行い、上記と同様に生成したDNA断片を分析した。2回目の濃縮操作後のPCR增幅物を用いて更にもう一度同様に濃縮操作を行い、生成したDNA断片を上記と同様に分析した。

各ステップでの変異遺伝子と正常遺伝子の検出に関して結果を表4に示す。

表-4

	正常遺伝子	変異遺伝子
濃縮操作なし	++	-
濃縮操作1回	++	+
濃縮操作2回	+	++
濃縮操作3回	+	++

++ : バンドがはっきりと検出できた。

+ : 不鮮明であるがバンドらしきものが検出できた。

- : バンドが検出できない。

表4の結果から、この濃縮方法によれば、目的核酸の特定領域に関して、正常遺伝子と、正常遺伝子とはわずかに異なる塩基配列を有する変異核酸とが混在する検体から、変異核酸を選択的に分離・捕獲して検体中の微量な変異核酸を検出し得ることが確認された。

## 請求の範囲

1. 目的核酸の特定領域の変異核酸を選択的に濃縮する方法であ  
って、

5 下記工程（1）～（3）

（1）目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製する工程、

（2）目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する核  
酸に固相担体と結合可能な標識物を導入した標識標準核酸を、上記  
試料核酸に対して等モル以上添加・混合し、コンペティティブハイ  
10 ブリダイゼーションを行う工程、

（3）コンペティティブハイブリダイゼーション後の反応液中に含  
まれる、固相担体と結合可能な標識物を有するハイブリダイゼーシ  
ョン生成物及び残存する標識標準核酸を固相担体にトラップして反  
応液から分離・除去する工程、

15 からなる一連の工程を1サイクルとし、該サイクルを1回若しくは  
複数回繰り返すか、又は上記サイクルを1回行った後、上記工程（2）  
と（3）を1回若しくは複数回繰り返すことを特徴とする変異核酸  
の濃縮方法。

20 2. 目的核酸の特定領域をプライマーを用いてPCR法により増  
幅し、試料核酸として一本鎖若しくは二本鎖のDNAを調製する請  
求の範囲第1項記載の記載の変異核酸の濃縮方法。

25 3. 標識標準核酸が、正常な塩基配列と相補な塩基配列を有する  
核酸標品を固相担体と結合可能な標識物を導入したプライマーを用  
いてPCR法により増幅して調製された一本鎖若しくは二本鎖DNA  
である請求の範囲第1項又は第2項記載の変異核酸の濃縮方法。

4. 標識標準核酸が、プラスミドベクター、ファージベクター、  
又はプラスミドとファージとのキメラベクターから選ばれる宿主／  
ベクター系により調製された一本鎖若しくは二本鎖DNAに固相担  
体と結合可能な標識物を導入したものである請求の範囲第1項又は

第 2 項に記載の変異核酸の濃縮方法。

5. 上記固相担体に結合可能な標識物としてビオチンを用いると  
共に、固相担体の結合部位としてアビジン或いはストレプトアビジ  
ンを用いる請求の範囲第 1 項乃至第 4 項のいずれか 1 項に記載の変  
5 異核酸の濃縮方法。

6. 目的核酸が m R N A であり、この m R N A を逆転写酵素を用  
いて c D N A とし、これを増幅して試料核酸を調製する請求の範囲  
第 1 項乃至第 5 項のいずれか 1 項に記載の変異核酸の濃縮方法。

7. 目的核酸の特定領域の変異核酸を選択的に濃縮する方法であ  
10 って、

下記工程 (1') ~ (4')

(1') 目的核酸の特定領域を増幅すると共に、該増幅物に固相担  
体と結合可能な 2 種類の標識物を導入して標識試料核酸を調製する  
工程、

15 (2') 目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する  
標準核酸を、上記標識試料核酸に対して等モル以上添加・混合し、  
コンペティティブハイブリダイゼーションを行う工程、

20 (3') コンペティティブハイブリダイゼーション後の反応液を上  
記 2 種類の標識物のうちの一方の標識物と選択的に結合する第 1 の  
固相担体にトラップさせて、該一方の標識物を有するハイブリダイ  
ゼーション生成物を捕獲する工程、

25 (4') 上記 (3') 工程で捕獲したハイブリダイゼーション生成  
物を上記 2 種類の標識物のうちの他方の標識物と選択的に結合する  
第 2 の固相担体にトラップさせて、上記両標識物を有するハイブリ  
ダイゼーション生成物又はこのハイブリダイゼーション生成物由來  
の一本鎖核酸を捕獲する工程、

からなる一連の工程を 1 サイクルとし、該サイクルを 1 回若しくは  
複数回繰り返すか、又は上記サイクルを 1 回行った後、上記工程 (2')  
~ (4') を 1 回若しくは複数回繰り返すことを特徴とする変異核

酸の濃縮方法。

8. 目的核酸の特定領域を、第1の標識物を導入したプライマーと、第2の標識物を導入したプライマーとを用いてPCR法により増幅することにより、標識試料核酸を調製する請求の範囲第7項記載の変異核酸の濃縮方法。  
5

9. 上記第1及び第2の標識物としてビオチンとハプテンとを用いると共に、第1及び第2の固相担体の結合部位としてストレプトアビジン又はアビジンと抗体とを用いる請求の範囲第7項又は8項記載の変異核酸の濃縮方法。

10. 標準核酸が、正常な塩基配列と相補な塩基配列を有する核酸標品をプライマーを用いてPCR法により増幅して調製された一本鎖若しくは二本鎖DNAである請求の範囲第7項乃至第9項のいずれか1項に記載の変異核酸の濃縮方法。

11. 標準核酸が、プラスミドベクター、ファージベクター、又はプラスミドとファージとのキメラベクターから選ばれる宿主/ベクター系により調製された一本鎖若しくは二本鎖DNAである請求の範囲第7項乃至第9項のいずれか1項に記載の変異核酸の濃縮方法。  
15

12. 目的核酸がmRNAであり、このmRNAを逆転写酵素を用いてcDNAとし、これを増幅して試料核酸を調製する請求の範囲第7項乃至第11項のいずれか1項に記載の変異核酸の濃縮方法。  
20

13. 請求の範囲第1項記載の方法により変異核酸の濃縮を行うための検査セットであって、

目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製するための試料核酸  
25 増幅用試薬と、

目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する核酸に固相担体と結合可能な標識物を導入した標識標準核酸と、

上記標識物と結合可能な部位を有する固相担体とを具備してなることとを特徴とする核酸濃縮用検査セット。

14. 請求の範囲第3項記載の方法により変異核酸の濃縮を行うための検査セットであって、

目的核酸の特定領域を増幅して試料核酸を調製するための試料核酸増幅用試薬と、

5 正常な塩基配列と相補な塩基配列を有する核酸標品を増幅可能なプライマーに固相担体に結合可能な標識物を導入した標識プライマーを含む標識標準核酸増幅用試薬と、

上記標識物と結合可能な部位を有する固相担体とを具備してなることを特徴とする核酸濃縮用検査セット。

10 15. 請求の範囲第7項記載の方法により変異核酸の濃縮を行うための検査セットであって、

目的核酸の特定領域を増幅すると共に、該増幅物に2種類の標識物を導入して標識試料核酸を調製するための標識試料核酸増幅用試薬と、

15 目的核酸の特定領域の正常核酸と相補な塩基配列を有する標準核酸と、

上記2種類の標識物のうちの一方の標識物と結合可能な部位を有する第1の固相担体と、

上記2種類の標識物のうちの他方の標識物と結合可能な部位を有する第2の固相担体とを具備してなることを特徴とする核酸濃縮用検査セット。

16. 請求の範囲第8項記載の方法により変異核酸の濃縮を行うための検査セットであって、

目的核酸の特定領域を増幅可能な2種類のプライマーにそれぞれ異なる標識物を導入した2種類の標識プライマーを含む標識試料核酸増幅用試薬と、

正常な塩基配列と相補な塩基配列を有する核酸標品を増幅可能な標準核酸増幅用試薬と、

上記2種類の標識物のうちの一方の標識物と結合可能な部位を有す

40

る第1の固相担体と、  
上記2種類の標識物のうちの他方の標識物と結合可能な部位を有す  
る第2の固相担体とを具備してなることを特徴とする核酸濃縮用検  
査セット。

5

10

15

20

25

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02617

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl<sup>6</sup> C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI, BIOSYS

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO, 95/02068, A1 (Wakunaga Pharmaceutical Co., Ltd.), January 19, 1995 (19. 01. 95) & EP, 664339, A1	1 - 16
A	EP, 362042, A1 (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale), April 4, 1990 (04. 04. 90)	1 - 16
A	JP, 5-508074, A (Kairon Corp.), November 18, 1993 (18. 11. 93) & WO, 91/14788, A & EP, 521111, A1 & US, 5200314, A	13 - 16
A	JP, 04-503158, A (Geneco PTY Ltd.), June 11, 1992 (11. 06. 92) & WO, 90/09455, A & EP, 457824, A & AU, 9051069, A	13 - 16
A	JP, 63-500007, A (Amjen Inc.), January 7, 1988 (07. 01. 88)	13 - 16

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

## • Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

November 19, 1996 (19. 11. 96)

Date of mailing of the international search report

December 10, 1996 (10. 12. 96)

Name and mailing address of the ISA/

Japanese Patent Office

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP96/02617

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& WO, 86/07387, A & EP, 227795, A & US, 5273882, A & DE, 3689412, G	

## A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int C1' C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int C1' C12Q1/68, C12N15/11, C07H21/04

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

WPI, BIOSYS

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO, 95/02068, A1 (湧永製薬株式会社) 19. 1月. 1995 (19. 01. 1995) &EP, 664339, A1	1-16
A	E.P., 362042, A1 (Institut National de la Sante et de la Recherche Medicale) 04. 4月. 1990 (04. 04. 1990)	1-16
A	J.P., 5-508074, A (カイロン コーポレイション) 18. 11月. 1993 (18. 11. 1993) &WO, 91/14788, A &EP, 521111, A1 &US, 5200314, A	13-16

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」同一パテントファミリー文献

## 国際調査を完了した日

19. 11. 96

## 国際調査報告の発送日

10.12.96

## 国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

## 特許庁審査官(権限のある職員)

鶴 飼 健

4B 9453



電話番号 03-3581-1101 内線 3449

## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP96/02617

C (焼き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	JP, 04-503158, A (ジェネコ・ビーテイーウイ・リミテッド) 11. 6月. 1992 (11. 06. 92) &WO, 90/09455, A &EP, 457824, A &AU, 9051069, A	13-16
A	JP, 63-500007, A (アムジェン) 7. 1月. 1988 (07. 01. 88) &WO, 86/07387, A &EP, 227795, A &US, 5273882, A &DE, 3689412, G	13-16